



๓๕ ๑๕ ๒๕๓๗

ผลงานอาจารย์

๑๔๕ การวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิคต่างๆ  
โดยวิธีไมเซลล์าร์โครมาโทกราฟี

โดย

นาย<sup>๑๐๐</sup>มานพ อรัญนารถ

รายงานฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากคณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

๒๗๖ ๖๖๐ ได้รับเงินอุดหนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ วิชาชีววิทยา, วิชาสารเคมีและ

๓๑๐ งานวิจัย

๒๖๐ \$๑๕ ๖๖๐ \$๖๐ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ §๑ [๒๕--๗]

๓๐๐ \$๑๕ ๒๒ หน้า

๖๑๐ \$๑๕ ๓๖๐

## บทคัดย่อ

ในการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน และลิโดเคนในยาตัวอย่างที่มีขายตามร้านขายยาทั่วไปจะพบว่าตัวยาคลอเฟนิรามีน มีปริมาณตัวยาที่วิเคราะห์ได้มากกว่าปริมาณที่บอกรว้ที่ฉลากโดยมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างอยู่ในช่วง 8-21 % สำหรับตัวยาลิโดเคนปริมาณของตัวยาที่วิเคราะห์ได้จะมีปริมาณที่น้อยกว่าปริมาณของตัวยาที่บอกรว้ที่ฉลาก โดยมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างอยู่ในช่วง 4-18%

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาโดยใช้วิธีโมเชลลาร์โครมาโตกราฟีนี้จะมีความแม่นยำในการทดลองโดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สูงสุด เท่ากับ 1.15 การทดลองมีความสะดวกและรวดเร็ว และผลการทดลองที่ได้ก็มีความเชื่อถือได้

## บทนำ

ยาที่ขายตามท้องตลาดทั่วไปมักประกอบด้วยตัวยาหลายชนิด เพื่อช่วยเสริมสร้างการออกฤทธิ์ให้ดีขึ้น การวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาในยาตัวอย่างให้ได้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำดีจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถแยกและหาปริมาณตัวยาที่ผสมอยู่ด้วยกันได้อย่างรวดเร็วและ ได้ผลที่เชื่อถือได้ วิธีวิเคราะห์หนึ่งที่มีขีดความสามารถสูงจนเป็นที่ยอมรับแล้วคือโครมาโทกราฟี

ไมเซลล์าร์โครมาโทกราฟี คือรีเวอร์สเฟสโครมาโทกราฟีที่ใช้สารละลายไมเซลล์เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาในตัวอย่างยาและใช้ในการวิเคราะห์ตัวยาในของเหลวในร่างกายโดยไม่ต้องผ่านการสกัดหรือแยกโปรตีนออกก่อน(1,10)

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ประกอบด้วย วิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน และ ลิโดเคนในตัวอย่างยา ที่มีขายตามร้านขายยาทั่วไปพร้อมทั้งเปรียบเทียบผลที่ได้กับค่าที่กำหนดไว้ที่ฉลาก

1. ศึกษาคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของตัวยาโดยวิธี UV-VIS สเปกโทรโฟโตเมตรี
2. ศึกษาเทคนิคของรีเวอร์สเฟสไมเซลล์าร์โครมาโทกราฟีและนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของตัวยาในยาตัวอย่างที่มีขายตามร้านขายยาทั่วไป

## การทดลอง

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Model 880-PU intelligent HPLC pump ของ Japan Spectroscopic Co., Ltd. (Jasco), Tokyo, Japan
2. Model 875-UV intelligent UV Spectrophotometric detector ของ Jasco
3. Model 7125 Rheodyne injection valve ขนาดของ sample loop = 20  $\mu$ l
4. Model U-228 Pantos Recorder ของ Nippon denshi Kagaku Co.,Ltd.,Kyoto,Japan
5.  $\mu$  - bondapak C18 และ  $\mu$ - bondapak CN ของ Water Associates (USA)  
ขนาด 3.9 mm x 30 cm

## สารเคมี

1. สารเคมีของ sigma ประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS), methanol, n-propanol, Lidocaine และ chlorpheniramine
2. ยาตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 11 ตัวอย่าง ได้จากร้านขายยาประกอบด้วยยาตัวอย่างที่ 1-5 มีคลอร์เฟนิรามีนเป็นองค์ประกอบ ยาตัวอย่างที่ 6-11 มีลิโดเคนเป็นองค์ประกอบ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

- ตัวอย่างที่ 1. ยาฉีดคลอร์เฟนิรามีน (chlorpheniramine injection, BP. 1980)  
 ส่วนประกอบ ในน้ำยา 1 mL มีตัวยาคลอร์เฟนิรามีนละลายอยู่ 10 mg  
 สรรพคุณ สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้เนื่องจากสาเหตุต่างๆ  
 ผู้ผลิต องค์การเภสัชกรรมกรุงเทพฯ
- ตัวอย่างที่ 2. ยาเม็ดคลอร์เฟนิรามีน (chlorpheniramine tablets. BP. 1980)  
 ส่วนประกอบ แต่ละเม็ด มีตัวยาคลอร์เฟนิรามีน มาเลเอท 4 mg  
 สรรพคุณ สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้เนื่องจากสาเหตุต่างๆ  
 ผู้ผลิต องค์การเภสัชกรรมกรุงเทพฯ
- ตัวอย่างที่ 3. ยาเม็ดคลอร์เฟนิรามีน มาเลเอท (chlorpheniramine maleate tablets.)  
 ส่วนประกอบ แต่ละเม็ด มีตัวยาคลอร์เฟนิรามีน มาเลเอท 4 mg  
 สรรพคุณ สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้เนื่องจากสาเหตุต่างๆ  
 ผู้ผลิต ห.จ.ก. ช่างูกิจเทรตดิ้ง กรุงเทพฯ
- ตัวอย่างที่ 4. ยาน้ำเชื่อมคลอร์เฟนิรามีน มาเลเอท(chlorpheniramine maleate syrup)  
 ส่วนประกอบ แต่ละ 5 mL มีตัวยาคลอร์เฟนิรามีน มาเลเอท 2 mg  
 สรรพคุณ สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้เนื่องจากสาเหตุต่างๆ  
 ผู้ผลิต บริษัท T.C.T. จำกัด, กรุงเทพฯ
- ตัวอย่างที่ 5. พิริตัน (Piriton)  
 ส่วนประกอบ แต่ละ 5 mL มีตัวยา  
 คลอร์เฟนิรามีน มาเลเอท บีพี 4 mg  
 แอมโมเนียมคลอไรด์ บีพี 125 mg  
 โซเดียมซิติเรท บีพี 55 mg  
 สรรพคุณ บรรเทาอาการไอและขับเสมหะ  
 ผู้ผลิต บริษัทแกรกซ์-วิทยาศาสตร์ จำกัด สมุทรปราการ

## ตัวอย่างที่ 6. ยาฉีดลิโดเคน ไฮโดรคลอไรด์ (Lidocaine hydrochloride injection)

ส่วนประกอบ แต่ละ 3 mL ประกอบด้วย ลิโดเคนไฮโดรคลอไรด์ 15.0 mg

สรรพคุณ เป็นยาชาเฉพาะแห่ง

ผู้ผลิต บริษัท ทาเคดา (ประเทศไทย) จำกัด

## ตัวอย่างที่ 7. Neo-Lidocaine 2 %

ส่วนประกอบ แต่ละ 1 mL ประกอบด้วย

Lidocaine HCl 20.0 mg/mL

Vasopressinum 0.25  $\mu$ L/mL

2-Norepinephrine 0.2 mg/mL

สรรพคุณ เป็นยาชาเฉพาะแห่ง

ผู้ผลิต Pharmaton Lugano 92, Switzerland

## ตัวอย่างที่ 8. ออโตแซมบอน (Otozambon)

ส่วนประกอบ แต่ละ 100 mL ประกอบด้วย

Furaltadon HCl 0.450 g

Polymyxin B Sulfate 1,000,000 U

Neomycin Sulfate (eq,Neomycin base) 0.375 g

Fluorohydrocortisone acetate 0.1 g

Lidocaine hydrochloride 4.00 g

Water propylene glycol and glycerin to 100 mL

สรรพคุณ Neomycin และ Polymyxin B เป็นแอนติแบคทีเรีย Nitrofurantoin มีสมบัติต่อต้านเชื้อ Staphylococci, gram-negative และ gram-positive เป็นตัวระงับการอักเสบ การแพ้ Lidocaine เป็นยาชาระงับความเจ็บปวด ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อในหู การที่มีตัวยาหลายชนิดทำหน้าที่ร่วมกัน ทำให้ออโตแซมบอนได้ผลในการรักษาการติดเชื้อ

ผู้ผลิต Zambon S.P.A., Italy แบ่งบรรจุโดย บริษัท เสริมมิตรพาณิชย์ จำกัด กรุงเทพฯ

## ตัวอย่างที่ 9. ไชโลพรอกอยน์เมนต์ (Xyloproct ointment)

ส่วนประกอบ ในยา 100 g ประกอบด้วย

Lidocaine 5 g Aluminium Acetate 5.5 g

Hydrocortisone Acetate 0.25 g Zinc Oxide 18 g

Cetamol Macrogol 400 and 4,000 Stearol g.s. to 100 g

สรรพคุณ บรรเทาอาการเจ็บปวดหรือระคายเคืองที่ทวารหนัก  
 ผู้ผลิต แอสตา โซเออร์ทัลยี สวีเดน แบ่งบรรจุโดย บริษัท โอลิก (ประเทศไทย)  
 จำกัด กรุงเทพฯ

ตัวอย่างที่ 10. ซอร์เมทเจล (Sore mouth gel)

ส่วนประกอบ ในยา 100 g ประกอบด้วย

Lignocaine (Lidocaine) 0.60 g

Cetylpyridium Chloride BP 0.02 g

Mentol BP 0.06 g

Eucalyptol BPC 0.10 g

Base g.s. to 100 g

สรรพคุณ เป็นยาที่มีกลิ่นหอมหวาน ประกอบด้วยยาชาเฉพาะที่ ยาแอนติเซปติกส์ บรรเทาอาการเจ็บปวดที่มีสาเหตุเนื่องจากบาดแผลหรือแผลเปื่อยภายในช่องปาก

ผู้ผลิต บริษัท บิวท์ส เมนูแฟคเจอร์ริง (ประเทศไทย) จำกัด สมุทรปราการ

ตัวอย่างที่ 11. เลมโมซิน แซนดอส (Lemocin Sandoz)

ส่วนประกอบ ในยาแต่ละเม็ด ประกอบด้วย

Tyrothricin 4 mg

Cetrimonium bromide 2 mg

Lidocaine 1 mg

สรรพคุณ บรรเทาอาการเจ็บปวดและรักษาการติดเชื้อในปากและลำคอ

## วิธีการทดลอง

### การเตรียมโมบายเฟส

เตรียม stock solution ของ sodium dodecyl sulfate (SDS) โดยชั่ง SDS มา 57.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร จากนั้นกรองสารละลายของ SDS ด้วย กระดาษกรองเมมเบรนขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 โมลาร์

เตรียมโมบายเฟสเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม เช่น ต้องการเตรียมโมบายเฟสที่มีความเข้มข้นของ SDS เท่ากับ 0.05 M ใน 5% ของ propanol เตรียมได้โดยนำสาร ละลายของ SDS เข้มข้น 0.1 โมลาร์

จาก stock solution มา 0.5 ลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร เติม propanol จำนวน 50 mL เติมน้ำกลั่นลงไปจนถึงขีดวัดปริมาตร กรองด้วยกระดาษกรองเมมเบรนขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  สารละลายโอบายเฟสที่ความเข้มข้นอื่น สามารถเตรียมได้ในทำนองเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 โอบายเฟสที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

โอบายเฟส	ความเข้มข้น
1	0.02 M SDS ใน 5% ของ propanol
2	0.04 M SDS ใน 5% ของ propanol
3	0.08 M SDS ใน 5% ของ propanol
4	0.02 M SDS ใน 2.5% ของ propanol
5	0.02 M SDS
6	0.04 M SDS ใน 10% ของ propanol
7	0.01 M SDS ใน 10% ของ propanol
8	0.04 M SDS
9	0.1 M SDS
10	0.05 M SDS ใน 5% ของ propanol
11	0.02 M SDS ใน 10% ของ propanol

### การเตรียมสารละลายมาตรฐานของคลอเฟนิรามีน

เตรียม stock solution ของคลอเฟนิรามีน โดยการชั่งสารมาตรฐานของคลอเฟนิรามีน 0.10 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml (จะได้ความเข้มข้น = 1 mg/mL)

จาก stock solution ปิเปตสารละลายมาปริมาตร 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, และ 15.0 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL หมายเลข 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นในแต่ละขวดจนถึงขีดบอกปริมาตร จากขวดวัดปริมาตรหมายเลข 1 ถึง 6 ปิเปตสารละลาย ขึ้นมา 5 ml ใส่ลงไป ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 ml แล้วเติมโอบายเฟสจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเป็น 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 ppm ตามลำดับ

## การเตรียมสารละลายมาตรฐานของลิโดเคน

เตรียม stock solution ของลิโดเคน โดยการชั่งสารมาตรฐานของลิโดเคน 0.05 g ละลายด้วยน้ำกลั่น จนครบ 100 ml (จะได้ความเข้มข้น = 0.5 mg/mL)

ปิเปตสารละลายจาก stock solution มา 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 และ 17.5 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL หมายเลข 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำกลั่นในแต่ละขวดจนถึงขีดบอกปริมาตร ปิเปตสารละลายจากขวดวัดปริมาตร หมายเลข 7 ถึง 12 มา 5 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL จากนั้นเติมโมบายเฟสจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของลิโดเคนเป็น 20, 30, 40, 50, 60, และ 70 ppm ตามลำดับ

## การเตรียมสารตัวอย่าง

### ยาอมเลมโมซิน (ยาเม็ด)

ชั่งน้ำหนักยาเม็ด 15 เม็ด และหาน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด จากนั้นบดยาให้ละเอียด ชั่งผงยาเทียบเท่ากับน้ำหนักเฉลี่ยต่อยาหนึ่งเม็ด เติมลงไปลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL ละลายด้วย 50% เมทานอล เล็กน้อย (จนยาละลายได้มากที่สุด) เติมโมบายเฟสจนครบ 25 mL จากนั้นกรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรองของ Whatman เบอร์ 1

### ยาฉีด lidocaine ของ Takeda

ปิเปตยาฉีด lidocaine นี้มา 1 mL ทำให้เจือจางเป็น 25 mL ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปิเปตมา 5 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL เติมโมบายเฟสจนถึงขีดบอกปริมาตร

### Sore mouth gel

ชั่งยามา 0.5 g ละลายด้วย 50% ของเมทานอล (จนยาละลายได้มากที่สุด) แล้วเติมน้ำจนครบ 25 mL จากนั้นปิเปตมา 10 mL แล้วเติมโมบายเฟสจนครบ 25 ml

### Otozambon (ยาน้ำ)

ปิเปตยามา 0.5 mL เติมน้ำเป็น 100 mL จากนั้นปิเปตมา 5 mL เติมโมบายเฟสจนได้ปริมาตร 25 mL



## Lidocaton (ยาฉีด)

ปิเปตยามา 1 mL เติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 mL จากนั้นปิเปตมา 5 mL แล้วจึงเติมโมบายเฟสจนได้ ปริมาตร 25 mL

## Xyloproct (ครีม)

ชั่งยามา 0.2 g ละลายด้วย 50% ของ methanol เล็กน้อย(จนละลายยาได้มากที่สุด) เติมน้ำจน ปริมาตรครบ 100 mL จากนั้นปิเปตมา 3 mL เติมโมบายเฟสจนครบ 25 mL กรองเอาตะกอนออก

## ยาเม็ดคลอเฟนิรามีน ของ Kentown และองค์การเภสัชกรรม

ชั่งน้ำหนักยาเม็ด 9 เม็ด หาน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด จากนั้นบดยาให้ละเอียด ชั่งผงยาเทียบเท่ากับน้ำหนัก เฉลี่ยต่อเม็ด ละลายด้วย 50% methanol เล็กน้อย จากนั้นเติมโมบายเฟสจนครบ 50 mL กรองเอา ตะกอนออก

## ยาฉีดคลอเฟนิรามีน

ปิเปตยามา 1 mL เติมน้ำจนปริมาตรเป็น 25 mL จากนั้นปิเปตมา 5 mL เติมโมบายเฟสจนปริมาตร ครบ 25 mL

## Piriton (ยาน้ำเชื่อม)

ปิเปตยามา 4 mL เติมน้ำลงไป 1 mL แล้วเติมโมบายเฟสจนปริมาตรเป็น 25 mL

## Chlorpheniramine

ปิเปตยามา 5 mL ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 25 mL จากนั้นเติมโมบายเฟสจนปริมาตรครบ 25 mL

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

### การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

หาโมบายเฟสและสเตรชันนารีเฟสที่เหมาะสม เมื่อทำการทดลองโดยการวัดค่า retention time ของตัว ยามาตรฐานของคลอเฟนิรามีน ความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้  $\mu$ - Bondapak C<sub>18</sub> สเตรชันนารีเฟส และโมบายเฟสชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 1 จะได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รีเทนชันไทม์ของตัวยามาตรฐานคลอเฟนิรามีน เมื่อสเตรชันนารีเฟส คือ  $\mu$ -Bondapak C18

	โมบายเฟส	รีเทนชันไทม์ (นาที : วินาที)
1	0.02 M SDS ใน 5% ของ propanol	2:48
2	0.04 M SDS ใน 5% ของ propanol	2:55
3	0.08 M SDS ใน 5% ของ propanol	2:30
4	0.02 M SDS ใน 2.5% ของ propanol	2:45
5	0.02 M SDS	2:49
6	0.04 M SDS ใน 10% ของ propanol	2:52
7	0.01 M SDS ใน 10% ของ propanol	2:56

จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่า ค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้มีค่าน้อยมาก แสดงว่าผลการทดลองที่ได้ไม่ดี เพราะ พิกของคลอเฟนิรามีนที่เกิดขึ้นอาจจะไปซ้อนทับกับพิกของ solvent ทำให้ไม่สามารถแยกสิ่งเจือปนอื่น ออกจากสารที่สนใจได้ นอกจากนี้ไม่ว่าจะเปลี่ยนโมบายเฟสเป็นอย่างไร ก็จะไม่ทำให้ค่าของรีเทนชัน ไทม์นี้เปลี่ยนแปลงไปได้มากนัก ทั้งนี้เพราะว่า สเตรชันนารีเฟสที่ใช้ คือ C<sub>18</sub> นี้มีความเป็นขั้วน้อยมากจะ ดูดซับโมเลกุลของ SDS ไว้ที่ผิวและโมเลกุลของ SDS หันด้านที่มีขั้วลบ (OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, polar head group) ออกมาสัมผัสกับโมบายเฟสโดยตรงเมื่อคลอเฟนิรามีนซึ่งมีสภาพขั้วเป็นลบผ่านเข้าไปในคอลัมน์ ก็จะเกิดการผลักกันเองระหว่าง คลอเฟนิรามีนกับสเตรชันนารีเฟส ทำให้ตัวยากถูกจับอยู่ในคอลัมน์ได้น้อย ตัวยาก็ออกจากคอลัมน์ได้เร็ว ค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้จึงน้อย เมื่อทดลองเปลี่ยนสเตรชันนารีเฟสจาก C<sub>18</sub> ไปเป็น CN พบว่าให้ผลการทดลองดัง ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 รีเทนชันไทม์ของตัวยามาตรฐานคลอเฟนิรามีน และลิโดเคน  
เมื่อใช้สแตชันนารีเฟส คือ  $\mu$ -Bondapak CN

	โมบายเฟส	รีเทนชันไทม์ (นาทิจ : วินาที)	
		คลอเฟนิรามีน	ลิโดเคน
2	0.04 M SDS ใน 5% ของ propanol	8:11	11:15
7	0.01 M SDS ใน 10% ของ propanol	3:40	4:52
8	0.04 M SDS	8:59	12:32
9	0.1 M SDS	5:03	6:05
10	0.05 M SDS ใน 5% ของ propanol	5:05	6:42
11	0.02 M SDS ใน 10% ของ propanol	6:00	9:08

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่า เมื่อเปลี่ยนตัวสแตชันนารีเฟส จาก C-18 เป็น CN แล้ว ค่ารีเทนชันไทม์ของคลอเฟนิรามีนนี้จะมีค่ามากขึ้นทั้งนี้เป็นเพราะว่า  $\mu$ -Bondapak CN มีความ เป็นขั้วมากกว่า C<sub>18</sub> และไม่ดูดซับโมเลกุลของ SDS หรือดูดซับได้น้อยมากทำให้แรงผลักระหว่างคลอเฟนิรามีนกับสแตชันนารีเฟสมีค่าน้อย เป็นผลให้เกิดการแบ่งการละลายขึ้น ทำให้ค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้มากขึ้น

เมื่อพิจารณาถึงค่ารีเทนชันไทม์เมื่อใช้โมบายเฟสชนิดต่าง ๆ กัน จะได้ว่า ถ้าหากใช้โมบายเฟสที่มีแต่เฉพาะ SDS เพียงอย่างเดียว เมื่อความเข้มข้นของ SDS เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า รีเทนชันไทม์น้อยลง และที่ความเข้มข้นของ SDS เดียวกัน ถ้าหากมีการใช้ propanol ด้วยจะทำให้ค่ารีเทนชันไทม์น้อยลงกว่าเดิมอีก เพราะ propanol จะไปลดความเป็นขั้วของโมบายเฟสให้น้อยลงกว่าเดิม ทำให้ strength สูงขึ้นสารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้การวิเคราะห์เร็วขึ้น แต่ความเข้มข้นของ propanol ไม่ควรมีค่ามากกว่า 10% มิฉะนั้นจะทำให้สภาพของโมเชลล์ SDS ที่ใช้เป็นโมบายเฟสเสียคุณสมบัติไป

สำหรับโมบายเฟสที่เหมาะสมสำหรับคลอเฟนิรามีน คือ 0.05 M ของ SDS ใน 5% ของ propanol ซึ่งจะให้ค่ารีเทนชันไทม์ มีค่าเท่ากับ 5.05 นาที ซึ่งมีค่าที่เหมาะสม คือ ไม่เร็วหรือช้าจนเกินไป แต่ที่ไม่ใช้โมบายเฟสที่มีความเข้มข้น 0.1 M SDS ซึ่งให้ค่ารีเทนชันไทม์ที่ใกล้เคียงกัน เพราะว่าโมบายเฟสที่มี propanol ด้วยจะให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ดีกว่าคือ ให้สัญญาณ (พีค) ที่มีความแหลมมากกว่า

สำหรับลิโดเคน โมบายเฟสที่เหมาะสม คือ 0.1 M ของ SDS ซึ่งให้ค่ารีเทนชันไทม์ เท่ากับ 6:05 นาที สำหรับในกรณีของลิโดเคนนี้ค่ารีเทนชันไทม์ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ SDS ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จาก 0.04 M ไปเป็น 0.1 M จะทำให้รีเทนชันไทม์มีค่าลดลงจากเดิมประมาณครึ่งหนึ่ง คือ จาก 12 : 32 เป็น 6 : 05 นาที ตามลำดับและลักษณะของพีคในกรณีที่มี propanol ไม่ได้แตกต่างกันเหมือนในกรณีของคลอเฟนิรามีน

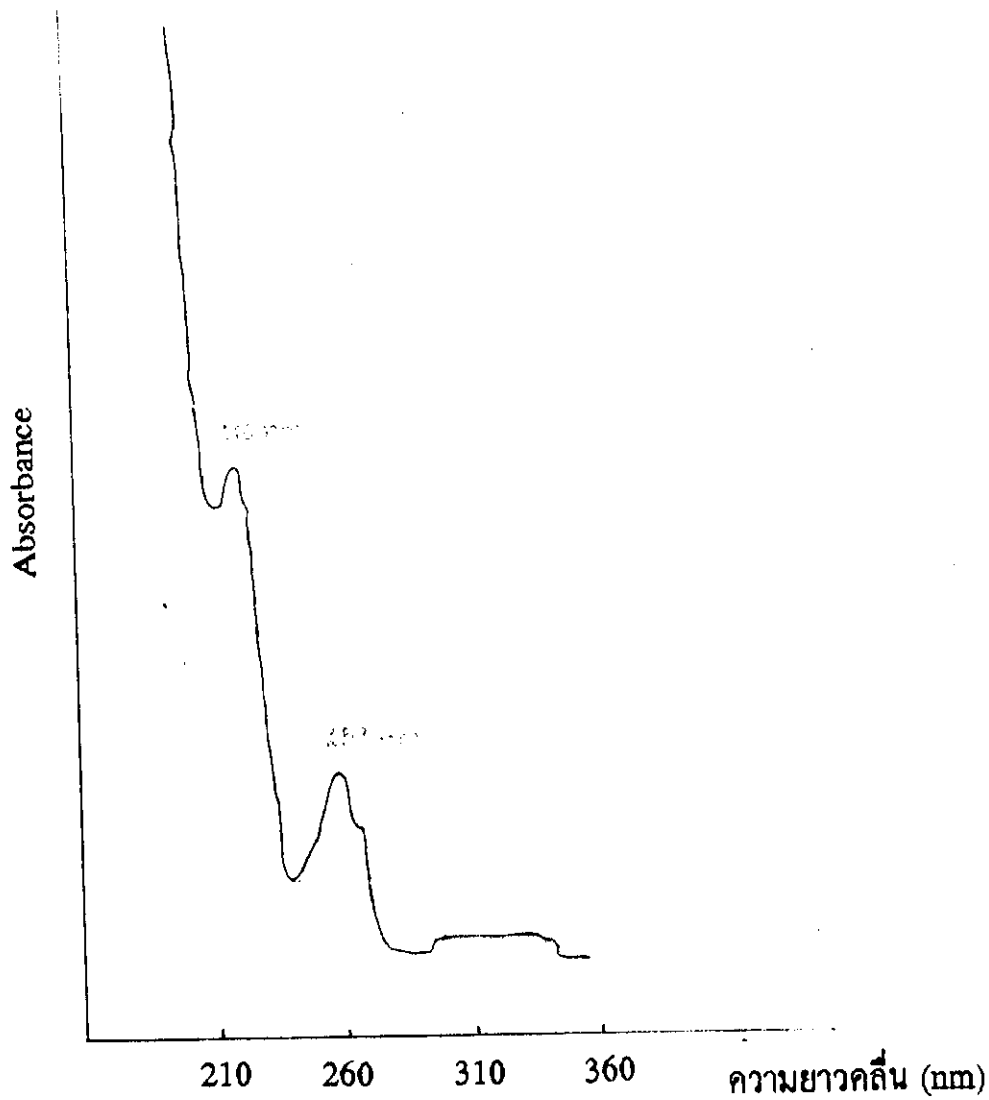
## การหาค่า $\lambda_{\max}$ ที่เหมาะสมสำหรับตัวยามาตรฐาน

การหาค่า  $\lambda_{\max}$  ที่เหมาะสมสำหรับตัวยามาตรฐานของคลอเฟนิรามีนและลิโดเคน โดยการใช้เครื่อง UV-VIS spectrometer จะได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 ส่วนสเปกตรัมที่ได้แสดงในรูปที่ 1 และ 2

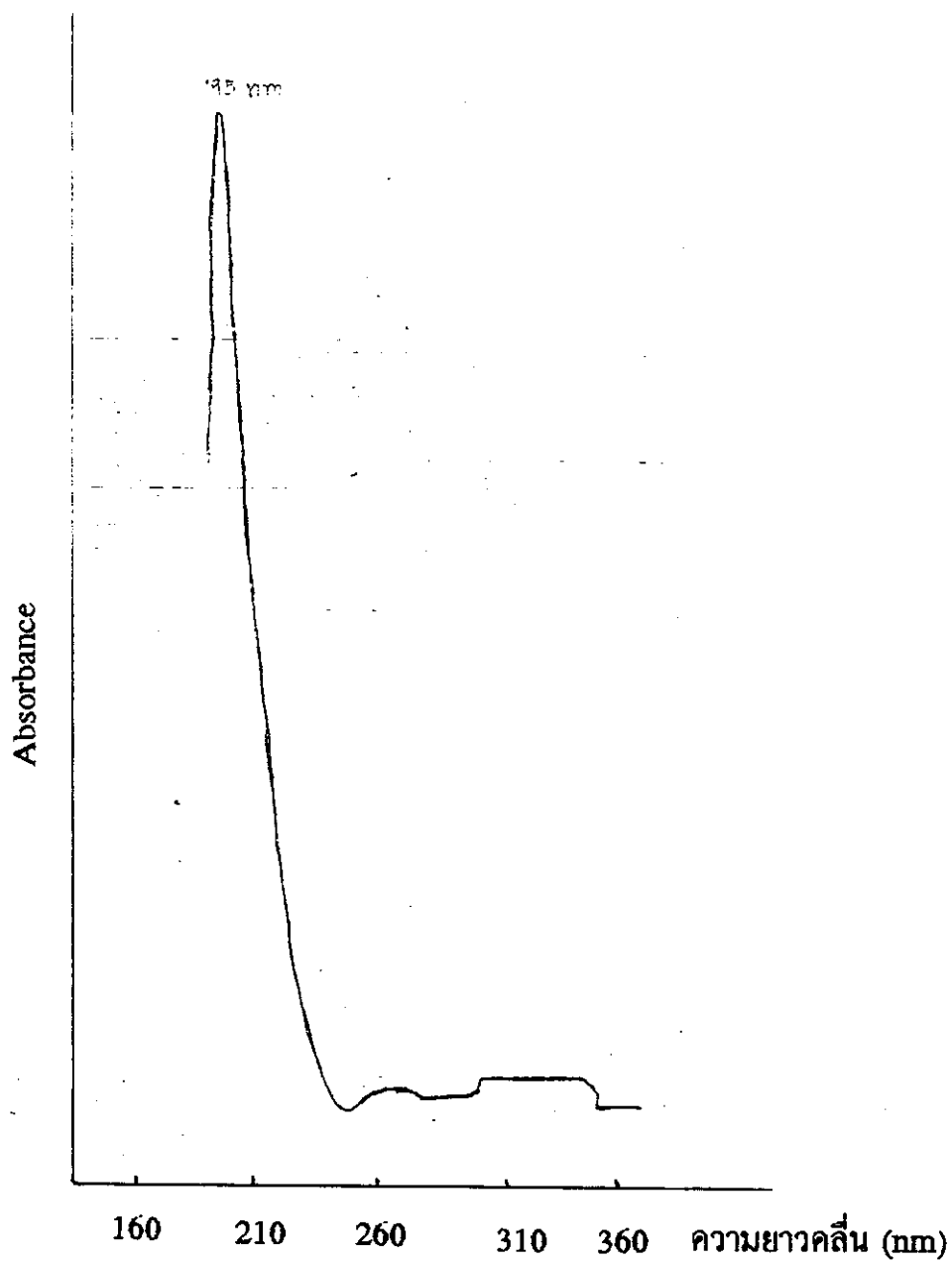
ตารางที่ 4 แสดงค่า  $\lambda_{\max}$  ของตัวยามาตรฐาน

ตัวยามาตรฐาน	$\lambda_{\max}$ (nm)
คลอเฟนิรามีน	259, 220
ลิโดเคน	195

จากการหาค่า  $\lambda_{\max}$  จะเห็นได้ว่า สเปกตรัมของคลอเฟนิรามีนมี  $\lambda_{\max}$  2 ค่า คือ ที่ 259 nm และ 220 nm จากการทดลองโดยการนำคลอเฟนิรามีนมาทำ โครมาโทแกรม ที่ความยาวคลื่น 220 nm และที่ 259 nm พบว่าโครมาโทแกรมที่ได้เมื่อความยาวคลื่นที่ใช้เป็น 220 nm จะให้พีคที่สูงกว่าโครมาโทแกรมที่ใช้ความยาวคลื่นที่ 259 nm เพียงเล็กน้อยและลักษณะพีคที่ได้ก็จะมีลักษณะไม่เรียบไม่สมมาตร ดังนั้นสำหรับคลอเฟนิรามีนได้เลือกใช้ความยาวคลื่นในการทดลองนี้ เท่ากับ 259 nm เพราะโครมาโทแกรมที่ได้มีความสม่ำเสมอ และมีความสมมาตรมากกว่า

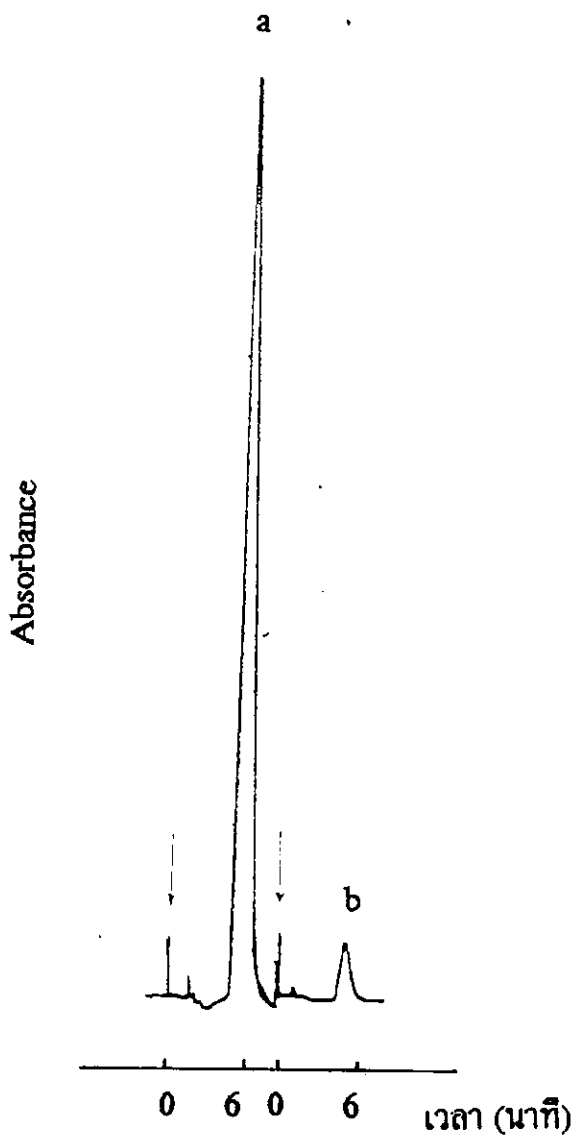


รูปที่ 1 แสดงสเปกตรัมของคลอเฟนิรามีน



รูปที่ 2 แสดงสเปกตรัมของลิโดเคน

สำหรับสเปกตรัมของลิโดเคนจะมีค่า  $\lambda_{\max}$  ที่ 195 nm แต่เนื่องจากดีเทคเตอร์ของ HPLC ใช้ D<sub>2</sub> lamp เป็นแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งจะให้แสงที่มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 190–600 nm ดังนั้นในการ ดีเทคสารจึงไม่ควรใช้แสงที่มีความยาวคลื่น 195 nm เพราะความยาวคลื่นที่ 195 nm นี้ จะเป็นช่วงของ far UV ซึ่งมีพลังงานมากและความยาวคลื่นนี้จะมีค่าใกล้เคียงกับขีดจำกัด ของแหล่งกำเนิดแสงของ ดีเทคเตอร์มาทำให้แสงที่ได้จากแหล่งกำเนิดแสงมีความไม่สม่ำเสมอซึ่งจะทำให้ผลการทดลองผิดพลาด ได้ง่าย ดังนั้นสำหรับลิโดเคนจะเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 220 nm เพราะลิโดเคน จะมีการดูดกลืนแสงที่ 220 nm ได้ดีกว่าที่ 259 nm มาก ซึ่งจะเห็นได้จากโครมาโทแกรมที่ได้เมื่อใช้ความยาวคลื่นที่ 220 nm จะมีพีคที่สูงมาก เพื่อเทียบกับเมื่อ ใช้ความยาวคลื่นที่ 259 nm ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของตัวยา lidocaine ที่ความเข้มข้น 50 ppm เมื่อ

a) ใช้  $\lambda = 220 \text{ nm}$

b) ใช้  $\lambda = 254 \text{ nm}$

colum :  $\mu$ -Bondapak-CN, Mobile phase = 0.1 M SDS

flow rate = 1 ml/min, range = 0.08 AUFS

chart speed = 10 cm/h



## สรุป สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

### สำหรับคลอเฟนิรามีน

- stationary phase คือ  $\mu$ -Bondapak CN
- mobile phase คือ 0.05 M ของ SDS ใน 5% propanol
- ความยาวคลื่นของดีเทคเตอร์ที่ใช้ คือ 259 nm
- range = 0.08 AUFS
- flow rate = 1.0 ml/min
- chart speed = 10 cm/min

### สำหรับลิโดเคน

- stationry phase คือ  $\mu$ -Bondapak CN
- mobile phase คือ 0.1 M ของ SDS
- ความยาวคลื่นของดีเทคเตอร์ที่ใช้ คือ 220 nm
- range = 0.08 AUFS
- flow rate = 1.0 ml/min
- chart speed = 10 cm/min

### การหาปริมาณของคลอเฟนิรามีนในยาตัวอย่าง

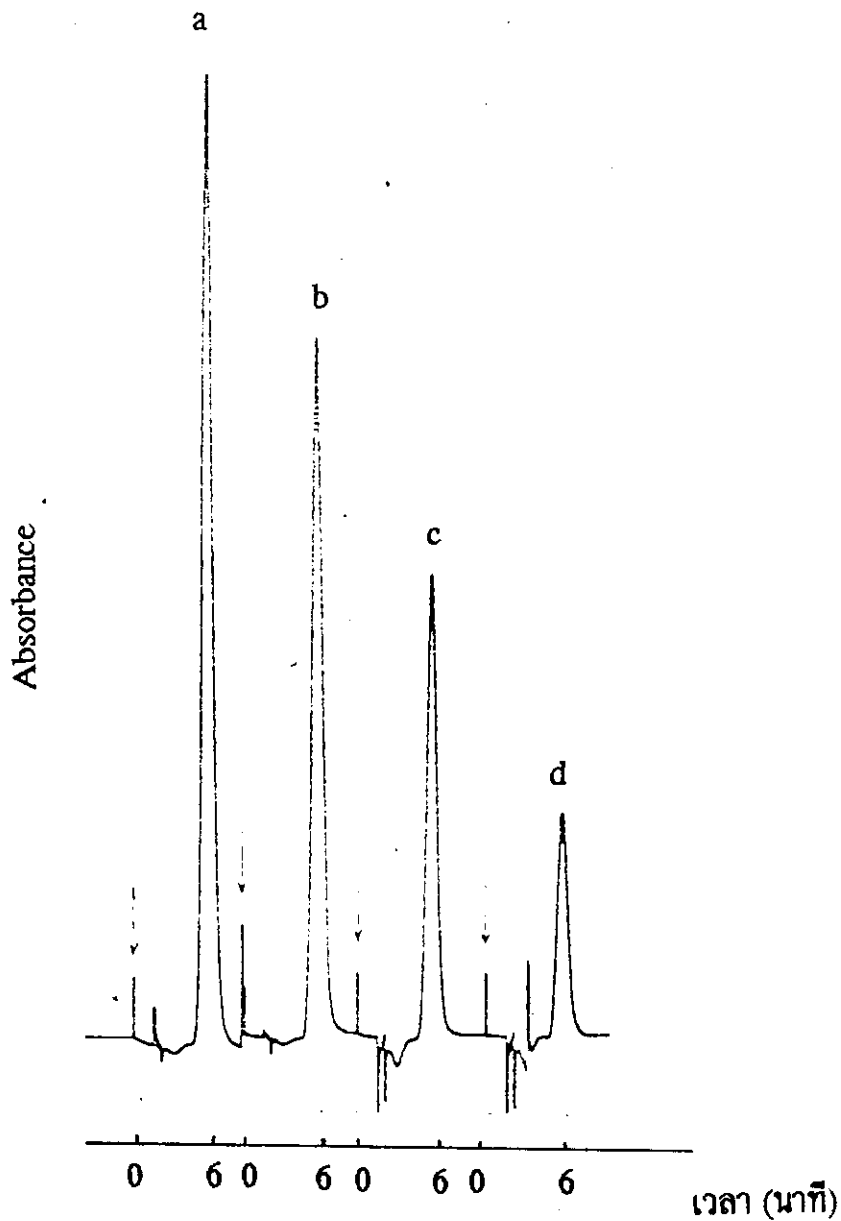
สำหรับการหาปริมาณตัวยาคลอปเฟนิรามีนในยาตัวอย่างที่ 1-5 นี้ ใช้วิธีสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ซึ่งทำได้โดยการนำเอาสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณหรือความเข้มข้นที่แน่นอนหลาย ๆ ความเข้มข้นมาทำโครมาโทแกรม จากนั้นวัดความสูงของพีคแต่ละอันแล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการพล็อตกราฟระหว่างความสูงของพีคเทียบกับ ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

เมื่อทำโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างและวัดความสูงของพีคได้แล้ว ก็สามารถนำมาอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานได้ ในการทดลองได้ทำการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยรวมทั้งหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ด้วย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างรีเทนชันไทม์และความสูงของพีคของตัวอย่าง  
คลอเฟนิรามีนและตัวอย่าง

สารที่ใช้	ความเข้มข้น	ค่ารีเทนชันไทม์		ความสูงของพีค		จำนวนครั้งที่ฉีด
	ppm	X (วินาที)	SD	X	SD	
คลอเฟนิรามีน	20	299.0	1.00	2.03	0.058	3
คลอเฟนิรามีน	40	299.6	0.58	4.07	0.058	3
คลอเฟนิรามีน	60	301.0	0.00	5.90	0.000	3
คลอเฟนิรามีน	80	301.3	0.29	7.86	0.029	3
คลอเฟนิรามีน	100	301.7	0.26	9.90	0.000	3
คลอเฟนิรามีน	120	301.3	0.30	11.90	0.100	3
สารตัวอย่าง 1	-	299.0	1.00	8.92	0.076	3
สารตัวอย่าง 1	-	297.0	0.00	8.57	0.058	3
สารตัวอย่าง 1	-	293.0	0.00	9.60	0.050	3
สารตัวอย่าง 1	-	299.8	0.29	8.95	0.050	3
สารตัวอย่าง 1	-	298.3	0.58	8.51	0.029	3

สำหรับรูปที่ 4 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างมาตรฐานของลิโดเคนซึ่งจะเห็นได้ว่า ความสูงของพีคจะลดลงเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นที่ลดลง



รูปที่ 4 แสดงโครมาโตแกรมของตัวยา lidocaine ที่ความเข้มข้น

- a) 40 ppm
- b) 30 ppm
- c) 20 ppm
- d) 10 ppm

column :  $\mu$ -Bondapak-CN, mobile phase = 0.1 M SDS

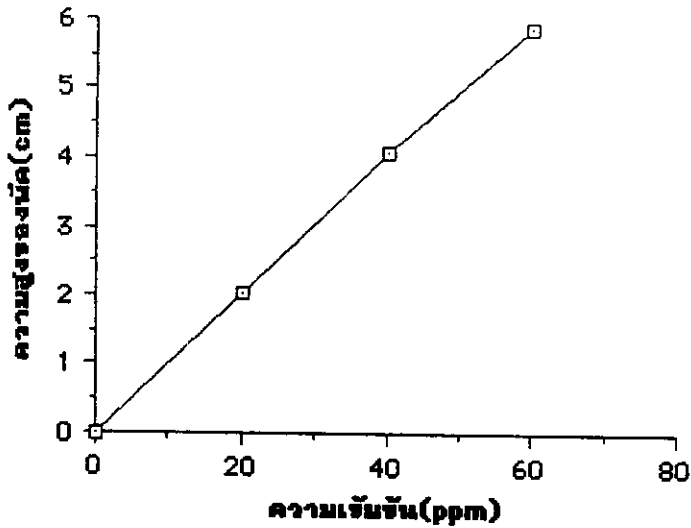
flow rate = 1 ml/min

range = 0.08

wavelength = 220 nm

chart speed = 10 cm/h

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 นำข้อมูลของตัวยามาตรฐานคลอเฟนิรามีนสร้างเป็นกราฟมาตรฐานได้ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงกราฟมาตรฐานของคลอเฟนิรามีน

ปริมาณของตัวยาคลอปเฟนิรามีนในยาตัวอย่างที่ 1-5 และเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างปริมาณบนฉลากยากับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณของตัวยาคลอปเฟนิรามีน ในยาตัวอย่างที่วิเคราะห์ และเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง

ปริมาณตัวยาคลอปเฟนิรามีน			
สารตัวอย่าง	จากฉลากยา	จากการวิเคราะห์	% ความแตกต่าง
1	10 mg/ml	11.25 mg/ml	12.5
2	4 mg/เม็ด	4.31 mg/เม็ด	7.8
3	4 mg/เม็ด	4.83 mg/เม็ด	20.8
4	0.4 mg/ml	0.45 mg/ml	12.5
5	0.5 mg/ml	0.54 mg/ml	8.0

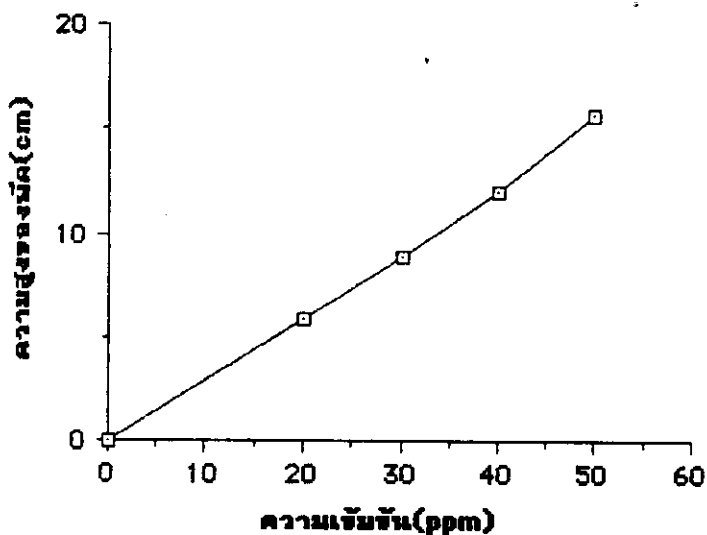
## การหาปริมาณลิโดเคนในยาตัวอย่าง

สำหรับการหาปริมาณของลิโดเคน ในยาตัวอย่างที่ 6-11 ที่ใช้วิธีเดียวกับการหาปริมาณของคลอเฟนิรามีน และในการทดลองได้ทำซ้ำกัน 3 ครั้ง ซึ่งจะให้ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างรีเทนชันไทม์และความสูงของพีค ของตัวยามาตรฐานลิโดเคน และยาตัวอย่าง

สารที่ใช้	ความเข้มข้น	รีเทนชันไทม์		ความสูงของพีค(cm)		จำนวนครั้งที่ฉีด
	ppm	x (วินาที)	SD	x	SD	
ลิโดเคน	20	363.5	1.00	5.87	0.028	3
ลิโดเคน	30	362.8	0.29	8.87	0.058	3
ลิโดเคน	40	362.6	0.58	12.02	0.076	3
ลิโดเคน	50	359.3	0.58	15.72	0.029	3
ลิโดเคน	60	356.0	1.00	19.76	0.273	3
สารตัวอย่างที่ 6	-	355.3	0.58	10.55	0.100	3
สารตัวอย่างที่ 7	-	364.3	1.15	10.37	0.115	3
สารตัวอย่างที่ 8	-	363.0	0.00	9.63	0.144	3
สารตัวอย่างที่ 9	-	367.3	0.58	3.40	0.000	3
สารตัวอย่างที่ 11	-	360.8	0.29	12.85	0.100	3
สารตัวอย่างที่ 12	-	370.7	0.58	11.43	0.076	3

จากผลการทดลองที่ได้ นำข้อมูลของความเข้มข้นของตัวยามาตรฐานของลิโดเคน และความสูงของโครมาโตแกรมมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) และหาปริมาณของตัวยาลิโดเคนในยาตัวอย่างที่ 6-11 ดังแสดงในรูปที่ 6 และตารางที่ 8



รูปที่ 6 แสดงกราฟมาตรฐานของลิโดเคน

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณของตัวยาลิโดเคน ในยาตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้

สารตัวอย่าง	ปริมาณตัวยาลิโดเคน		
	จากฉลากยา	จากการวิเคราะห์	% ความแตกต่าง
6	5 mg/ml	4.44 mg/ml	11.2
7	20 mg/ml	17.50 mg/ml	12.5
8	40 mg/ml	33.00 mg/ml	17.5
9	5 g/100 g	4.29 g/100 g	14.2
10	0.6 g/100 g	0.53 g/100 g	11.7
11	1 mg/เม็ด	0.96 mg/เม็ด	4.0

### สรุปผลการทดลอง

ในการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีนและลิโดเคนในยาตัวอย่างที่มีขายอยู่ในท้องตลาดจะเห็นได้ว่าในกรณีของตัวยาคลอเฟนิรามีนจะมีปริมาณตัวยาที่วิเคราะห์ได้จะมีมากกว่าปริมาณที่บอกไว้ที่ฉลากโดยจะมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างอยู่ในช่วง 8-21 % ซึ่งถือได้ว่ามีปริมาณของตัวยาเข้ามาตรฐาน ตามเกณฑ์

ตำรับ ซึ่งกำหนดให้บริษัทผลิตยาโดยมีปริมาณของคลอเฟนิรามีนมีความเบี่ยงเบนอยู่ในช่วง 90–110% ของปริมาณที่กำหนดไว้ที่ฉลากสำหรับตัวยาลิโดเคนปริมาณของตัวยาที่วิเคราะห์ได้จะมีปริมาณที่น้อยกว่าปริมาณของตัวยาที่บอกไว้ที่ฉลาก โดยมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างอยู่ในช่วง 4–18% ซึ่งอาจเป็นเพราะตัวยา lidocaine ที่มีอยู่ อาจเกิดการเสื่อมสลายไปได้บางส่วน จึงทำให้ปริมาณที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อย

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาโดยใช้วิธีเอนไซม์เคลลาร์โครมาโตกราฟฟีนี้จะมีความแม่นยำในการทดลองโดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สูงสุด เท่ากับ 1.15 การทดลองมีความสะดวกและรวดเร็ว และผลการทดลองที่ได้ก็มีความเชื่อถือได้

## เอกสารอ้างอิง

1. Arunyanart, M., Cline Love, L.J. *Anal. Chem.* 1984, 56, 1557-1561
2. Deluccia, F., Arunyanart, M., Cline Love, L.J. *Anal. Chem.* 1985, 57, 1564-1568.
3. DeLuccia, F., Arunyanart, M., Yarmchuck, P., Weinberger, R., Cline Love, L.J. *Liq. Chromatogr.* 1985, 9, 794-800.
4. Cline Love, L.J., Zibas, S., Noroski, J., Arunyanart, M. *J. Pharm. Biomed. Appl.* 1985, 3, 511-521.
5. Arunyanart, M., Cline Love, L.J. *J. Chromatogr, Biomed. Appl.* 1985, 324, 293-301.
6. Arunyanart, M., Cline Love, L.J. *Anal. Chem.* 1985, 57, 2837-2843.
7. Armstrong, D.W., Nome, F. *Anal. Chem.* 1981, 53, 1662-1666
8. Dorsey, J.G., DeEchegarey, M.T., Landy, J.S. *Anal.Chem.* 1983, 55, 924-8